試験研究用　　マニュアル 2015/5

動物種判別 LAMP 法用プライマーセット ブタ用

製品コード: NE3021

【はじめにお読み下さい】

このたびは、**動物種判別 LAMP 法用プライマーセット ブタ用**をお買い上げ頂き、誠にありがとうございます。このマニュアルをよくお読みの上、正しい方法で試薬を使用して下さい。

使用上の注意

1. 本品は、LAMP 法を用いて動物種（ブタ）を判別するための試験研究用試薬です。医療行為および臨床診断等の目的では使用できません。

2. 試薬は-20℃ の冷凍庫内に遮光して保存し、納品後 6 ヵ月以内に使用して下さい。また、試薬の凍結、融解の繰り返しは避けて下さい。

3. 本品を使用する際は、この**マニュアル**の記載内容に従って下さい。記載内容と異なる使用方法および使用目的により発生するトラブルに関しましては、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承下さい。

4. 本品は LAMP 法用 DNA 増幅試薬セット-動物種・植物病検査専用 A-（製品コード: NE6021）と組み合わせて使用します。Loopamp® DNA 増幅試薬キットとは組み合わせて使用することはできません。

5. 本品による判定結果を二次利用する場合は、必ず使用者の責任の下で行って下さい。製品性能の異常によって発生するトラブルの場合を除き、株式会社ニッポンジーンでは一切の責任を負いかねますので、あらかじめご了承下さい。

6. 検査環境の汚染を防ぐため、LAMP 法反応後の増幅産物の電気泳動等の操作およびオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないで下さい。

7. LAMP 法は栄研化学株式会社が特許を保有しています。株式会社ニッポンジーンは、本品の製造および販売を許諾されています。

8. **動物種判別 LAMP 法用プライマーセット ブタ用**は、株式会社富士通システムズ・イーストが運営する、e Genome Order（**イーゲノムオーダー**）より販売しています。ご購入に関しては、株式会社富士通システムズ・イーストまでお問い合わせ下さい。

株式会社富士通システムズ・イースト
e Genome Order（イーゲノムオーダー）; http://genome.e-mp.jp/

本製品を用いた測定には LAMP 法専用濁度測定装置を使用します。

エンドポイント濁度測定装置 LT-16（製品コード: NE4011）の測定用パラメータの設定に関しては、株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせ下さい。

株式会社ニッポンジーン; http://nippongene-analysis.com/

TEL　076-451-6548

FAX　076-451-6547

Ⅰ 製品説明

【動物種判別 LAMP 法用プライマーセット ブタ用の概要】

本製品は LAMP 法用 DNA 増幅試薬セット−動物種・植物病検査専用 A−と組み合わせて使用する、動物種（ブタ）判別用のプライマーセットです。LAMP 法はインフルエンザウィルス感染の診断およびノロウィルス、レジオネラ属菌、サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌等の検査にも用いられている迅速、簡便な DNA 増幅技術であり、その優れた特異性と高い感度を最大の特徴としています。本製品に含まれる LAMP 法用プライマーは、ブタ DNA の特異的な遺伝子領域内に設計されているため、LAMP 法による DNA の増幅の有無から検体中にブタ DNA が存在するかを判定します。

本製品では、DNA 増幅法として LAMP 法を用いているため、DNA 増幅に必要な時間が短時間であり、サンプル由来の阻害物等の影響も受け難いです。付属の DNA 抽出液は、非常に簡便な操作で DNA を抽出することができるので、高感度、迅速、簡便な動物種判別を行うことができます。

また、エンドポイント濁度測定装置 LT−16 などの LAMP 法専用の濁度測定装置や LAMP 法用 DNA 増幅試薬セット−動物種・植物病検査専用 A−に付属する検出液を用いることにより検出に電気泳動を必要とせず、DNA 増幅から検出までを閉鎖系（同一反応チューブ内）で行うため、検査のコンタミネーションのリスクがなく、短時間で動物種の判別を行うことが可能です。

【動物種判別について】

動物種判別は食品や薬品などの原材料などに異物が混入していないかを判断するための目的で行われています。動物種を判別するための技術として、高速クロマトグラフィーなどの理化学的手法、イムノクロトマト法などの免疫学的手法、PCR 法などの分子生物学的手法が用いられています。

近年では PCR 法が高感度であるとして一般的に使用されていますが、その工程が煩雑かつ時間を要する点やサンプル由来の物質が原因となる DNA 増幅阻害などが課題とされていました。

【LAMP（Loop − mediated Isothermal Amplification）法】

LAMP 法は、一定温度で DNA 増幅反応が進行する画期的な技術です。従来の方法と比較して特異性に優れ、またその高い DNA 増幅効率から、短時間反応および簡易検出が可能である等の利点を有しています。

LAMP 法の原理の詳細については、栄研化学株式会社ホームページをご参照下さい。

栄研化学株式会社
Eiken GENOME SITE; http://loopamp.eiken.co.jp/

【本品に含まれる合成オリゴヌクレオチドについて】

本品に含まれるプライマーは全て「リライアブル&トレーサブルオリゴ」を使用しています。「リライアブル&トレーサブルオリゴ」は、株式会社ニッポンジーン マテリアルが製造する高信頼性オリゴヌクレオチド「リライアブルオリゴ」の一つです。ISO 13485:2003 に準拠した品質マネジメントシステム、専用陽圧ルームでの製造、チェックリストによる工程管理、トレーサビリティー完備を特徴としています。詳細に関しましては、株式会社ニッポンジーン マテリアルホームページをご参照下さい。

株式会社ニッポンジーン マテリアル; http://www.nippongenematerial.com/

II 製品内容

【製品内容】

動物種判別 LAMP 法用プライマーセット ブタ用
48 テスト用（製品コード: NE3021 ）

内容	頭部ラベル色	内容量	保存温度
Primer Mix Ssd (PM Ssd)	赤色	125 μL	−20℃（遮光）
DNA 抽出液	白色	12.5 mL × 4 本	−20℃（遮光）※
Positive Control Ssd (PC Ssd)	灰色	40 μL	−20℃（遮光）

マニュアル（本紙）一部

※ 凍結融解後は室温で保存して下さい。

取扱い上の注意

- ◆ 試薬は−20℃で暗所に保存し、納品後 6 ヵ月以内に使用して下さい。
- ◆ 試薬は DNA 抽出液を除き、使用ごとに融解し、残った試薬は再度−20℃で保存して下さい。DNA 抽出液は−20℃から取り出し、融解させた後は室温で保存し、凍結融解を繰り返さないようにして下さい。凍結、融解の繰り返しにより性能が低下する可能性がありますので、必要な場合は試薬を数回分ごとに小分けして保存して下さい。
- ◆ Positive Control Ssd にはブタ DNA に特徴的な配列が含まれています。検査環境への汚染を防ぐため、使用の際には溶液を飛散させたり、溶液に触れたフィルター付きマイクロチップが他の器具や試薬に接触しないようにご注意下さい。
- ◆ 連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、フィルター付きマイクロチップは 1 回分注するごとに使い捨てとして使用して下さい。

III 必要な器具、機器、試薬

- ● LAMP 法用 DNA 増幅試薬セット−動物種・植物病検査専用 A−（製品コード: NE6021）
- ● Loopamp 反応チューブ（栄研化学株式会社）
- ● マイクロピペット（0.5−10 μL、10−100 μL、100−1,000 μL）
- ● フィルター付マイクロチップ（滅菌済み）
- ● マスターミックス調製用チューブ（1.5 mL あるいは 2.0 mL）
- ● ヒートブロック
- ● LAMP 法専用濁度測定装置
  エンドポイント濁度測定装置 LT−16（製品コード: NE4011）など
- ● 氷（クラッシュアイス）
- ● ピンセット（核酸の汚染がないもの）
- ● チューブラック
- ● アルミラック（あるいはプレートラック）
- ● ボルテックスミキサー
- ● 簡易遠心機（1.5 mL チューブ用および Loopamp 反応チューブ用）

IV 使用方法

コントロールの準備

■　コントロール

本品には、Positive Control Ssd が添付されています。検査の成否を確認するためには、陽性コントロールおよび陰性コントロールの作製が重要となります。

Positive Control Ssd 2.0 μL を鋳型として 25.0 μL(1 テスト分)の容量で LAMP 法を行い、64℃、30 分間で反応が起動することを確認しています。

器具、機器の準備

■　LAMP 法専用濁度測定装置

操作の詳細は各装置の取扱説明書をご参照下さい。

■　器具

器具	使用方法
マイクロピペット	原則として各区域専用とし、もし他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻して下さい。
チューブラック	原則として各区域専用とし、もし他の区域で使用した場合は核酸除去操作を施してから元の場所に戻して下さい。
チューブ	市販のガンマ線滅菌済チューブ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択して下さい。
フィルター付マイクロチップ（滅菌済）	市販のガンマ線滅菌済疎水性フィルター付チップ等、核酸フリー、ヌクレアーゼフリーのグレードを選択し、各区域にて開封して下さい。また、連続分注を行うと試薬への汚染が発生する可能性がありますので、1 回ごとに使い捨てとして使用して下さい。
筆記用具	各区域専用とし、持込書類を置く専用のスペースを確保して下さい。
手袋	使い捨てとし、汚染が疑われる場合はすぐに手袋を交換して下さい。
白衣	各区域専用とし、袖口からの汚染に注意して下さい。

検査環境

LAMP 法は高感度な DNA 増幅技術であるため、検査環境に LAMP 反応後の増幅産物等、鋳型となる核酸の汚染が発生すると、以降正確な検査を行うことが困難になります。サンプルの取り扱いにおいては、作業用の着衣および器具への付着に十分注意し、着衣の交換を徹底して下さい。以後の検査における誤判定を防止するため、使用済みのチップ、チューブ、検査後サンプルは二重にしたビニール袋にまとめて廃棄して下さい。また、LAMP 反応後の増幅産物の電気泳動等による操作およびオートクレーブ高圧滅菌処理は行わないで下さい。

作業区域

核酸抽出および核酸増幅を実施していない（核酸による汚染が存在しない）クリーンベンチあるいは作業台を試薬調製作業区域とし、マスターミックスは試薬調製作業区域にて作製して下さい。試薬調製作業区域では LAMP 法において鋳型となる核酸を含む溶液、試薬類の取り扱いは行わないで下さい。マスターミックスへのサンプル添加を行うスペースは試薬調製作業区域と区分し、専用の核酸取扱区域を設けて下さい。

核酸除去操作

器具は常に清潔に保って下さい。洗浄が可能である器具は大量の水道水でよく濯ぐことにより、付着した核酸を希釈、除去できます。

高濃度の核酸を取扱った場合など、核酸による汚染が疑われるような場合には、0.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液を用いて検査環境中に存在する核酸の除去操作を行います。次亜塩素酸ナトリウム水溶液は塩素ガスを発生するので、使用の際には換気に十分注意して下さい。また、金属に対する腐食性があるため、金属に対して使用する際は、迅速に塩素成分を拭き取る等の対応が必要です。高温環境下における劣化が著しいため、0.5%水溶液調製後の経過日数や保存温度に注意して下さい。

非金属の器具は次亜塩素酸ナトリウム水溶液に 1 時間以上浸し、よく濯いで乾燥します。作業台、器具は常に清潔に保ち、定期的に次亜塩素酸ナトリウム水溶液による拭き取り清掃を行います。

<詳細な核酸除去方法>

i) 使い捨て手袋を装着します。
ii) 有効塩素濃度 5,000 ppm (0.5%) の次亜塩素酸ナトリウム水溶液を準備します。
iii) 次亜塩素酸ナトリウム水溶液を含ませたペーパータオルで作業台、器具を丁寧に拭き、5 分間そのまま放置します。
iv) 5 分間の処理が終了したら塩素成分をペーパータオルで拭き取り、その後、蒸留水等核酸の混入がない水を含ませたペーパータオルで確実に塩素成分を除去します。

【プロトコル】

1. DNA サンプルの調製

あらかじめ、動物種を判別する検体からDNAを調製して下さい。本製品は、様々な検体から簡易にDNAの抽出を行うためのDNA抽出液を備えていますので、測定を行う前に下記使用例などを参考にDNAを準備して下さい。また、市販のDNA抽出キット等を用いて抽出したDNAも使用可能です。しかし、1 mMを超えるEDTA（エチレンジアミン四酢酸）等のキレート化合物を含むと、誤判定の原因となりますので、抽出を行った際のDNAを溶解させる最適な溶媒としては核酸フリー水、あるいは10 mM Tri-HCl (pH 8.0) を推奨しています。

DNA抽出液（本製品付属）使用例

DNA抽出液は使用前に室温で完全に融解させ、白濁や沈殿物が無いことを確認します。
細切りした食用肉100 mgを1.5 mLチューブに入れ、チューブにDNA抽出液を1 mL添加し、56℃で15分間反応させます。抽出反応終了後、反応後サンプルをボルテックスミキサーにて1秒間×3回混合して均一にした後、スピンダウンを行います。スピンダウン後、上清を別のチューブに移します。

2. 検査反応

2-1. 試薬の融解

本品のPrimer Mix Ssd、Positive Control SsdとLAMP法用DNA増幅試薬セット−動物種・植物病検査専用A−の10x 反応バッファーA、dNTPs Mixture、ddWaterを室温で完全に融解します。
判定方法が濁度測定ではなく目視検出の場合は、検出液も同様に室温で完全に融解させて下さい。
ただし、増幅酵素については−20℃では凍結しないため、使用する直前にキットから取り出して下さい。

2-2. 混合とスピンダウン

各試薬をボルテックスミキサーにて 1 秒間×3 回混合して均一にした後、スピンダウンを行い、試薬を氷上に静置します。

2-3. マスターミックスの作製

マスターミックス調製用チューブ（1.5 mLあるいは2.0 mL)に下記の試薬を必要テスト数分ずつ分注し、ボルテックスミキサーにて1秒間×3回混合した後、スピンダウンを行います。これをマスターミックスとし、氷上に静置します。標準反応スケールは25 μLです。

試薬	1テスト分	例）8+1テスト分の場合
10x 反応バッファーA	2.5 μL	22.5 μL
Primer Mix Ssd	2.5 μL	22.5 μL
dNTPs Mixture	1.4 μL	12.6 μL
（検出液（濁度測定の場合は不要））	（1.0 μL）	（9.0 μL）
増幅酵素	1.0 μL	9.0 μL
ddWater	15.6 μL（14.6 μL）	140.4 μL（131.4 μL）
マスターミックス合計	23.0 μL	207 μL

2-4. マスターミックスの分注

Loopamp 反応用チューブを袋から取り出し、アルミブロックあるいはプレートラックに立て、マスターミックスを23 μLずつ分注します（Loopamp 反応用チューブを袋から取り出す際には、核酸の汚染がないピンセットを準備し、使用して下さい）。

2-5. サンプルの添加

まず、陰性コントロール用のチューブにddWaterを2.0 μL添加してキャップを閉じます。次にサンプル反応チューブに1で調製したDNAサンプルを2.0 μL添加してキャップを閉じます。最後に、陽性コントロール用のチューブにPositive Control Ssdを2.0 μL添加してキャップを閉じます。

2-6. 検査反応

検査反応の前にサンプルとマスターミックスを混合します。Loopamp 反応チューブの全てのキャップを閉じた状態でタッピング（チューブの腹を指で数回叩く）により混合した後、スピンダウンを行い、濁度測定装置あるいはインキュベーターにセットして64℃で30分間の測定を開始します。
ピペッティングによる混合をする場合は、2-5.のサンプルの添加ごとに行ってください。

重要

混合の際は気泡が発生しないように注意して下さい。ボルテックスミキサーによる撹拌は行わないで下さい。

2-7. 増幅酵素の失活

測定終了後には、80℃で 5 分間の熱処理により反応を停止し、判定を行います。

3. 判定

■ 濁度測定の場合

3-1. 検査の成否の判定

最初に、陽性コントロールで濁度が上昇し、陰性コントロールで濁度が上昇していないことを確認して下さい。これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を追究して下さい。

3-2. サンプルの判定

コントロールの判定においてその検査が有効と判断された場合、次にサンプルの判定を行います。判定はコントロールと同様に濁度上昇の有無を確認して下さい。陽性のサンプルに関しては Tt 値を確認して下さい。濁度上昇が認められる場合、サンプル中にブタ DNA が存在する可能性があります。

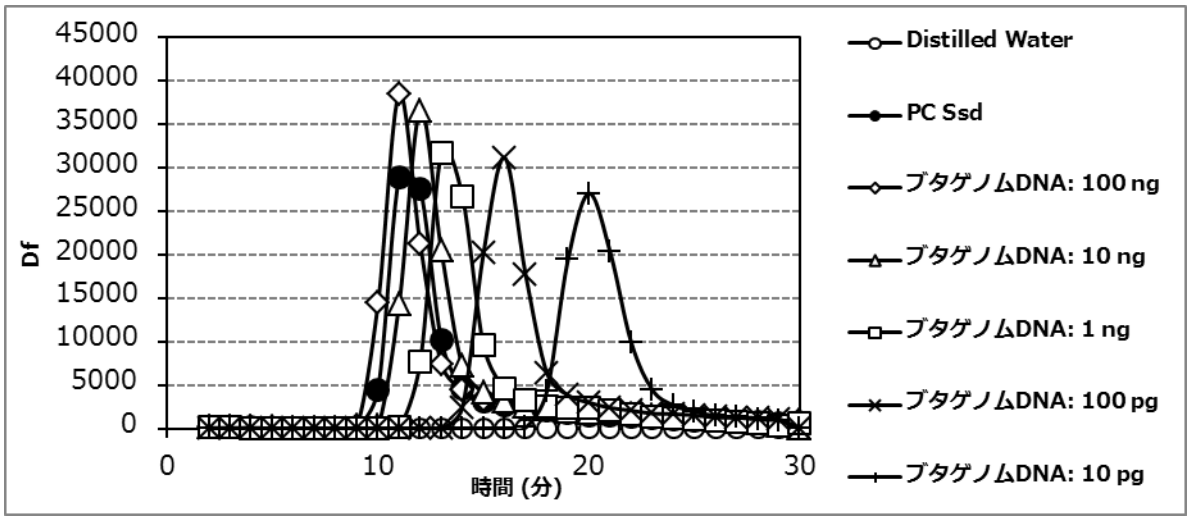

図 1: 本品を用いたエンドポイント濁度測定装置 LT-16 での濁度測定結果（ゲノム DNA の検出感度）

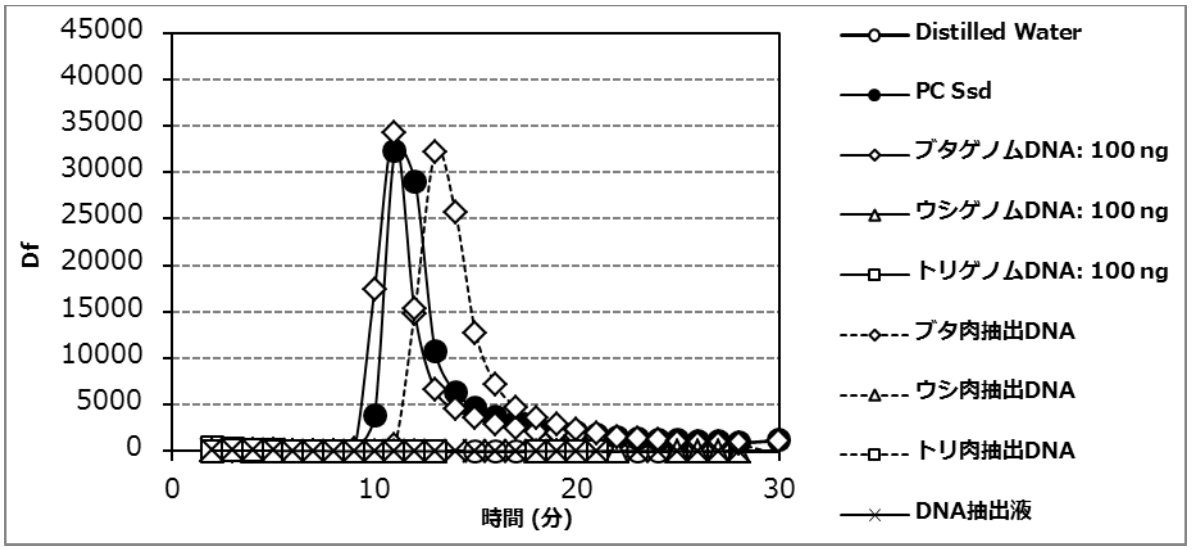

図 2: 本品を用いたエンドポイント濁度測定装置 LT-16 での濁度測定結果（他動物種との交差性検証）

■ 目視検出の場合

3-3. 検査の成否の判定

最初に、陽性コントロール検査溶液が空色に変化し、陰性コントロール検査溶液は青紫色のまま変色していないことを確認して下さい。

これを満たしていない場合は検査結果を無効とし、原因を追究して下さい。

＊ 陽性および陰性の検査溶液の色は、ニッポンジーンのホームページあるいはパンフレットをご確認下さい。

3-4. サンプルの判定

コントロールの判定においてその検査が有効とされた場合、次に、サンプルの判定を行います。判定はコントロール検査溶液と同様に色の変化の有無を確認して下さい。色の変化が認められる場合、サンプル中にブタ DNA が存在する可能性があります。

V トラブルシューティング

本品の使用において何らかの問題が発生した場合は、以下の項目に従って対処して下さい。その他の不明な点については株式会社ニッポンジーンまでお問い合わせ下さい。

問題点	原因および対処法
陰性コントロールが正確な結果を示さない（濁度が上昇している、色が変化している）	**A. 試薬あるいは検査環境に汚染が存在する。** 陰性コントロールで増幅が起こっている場合、鋳型となる核酸の混入が疑われます。試薬および検査環境の汚染モニタリング、0.5%次亜塩素酸ナトリウム水溶液による検査器具、機器類の拭き取り操作を行い、汚染を完全に除去した後に検査を実施して下さい。 **B. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 検査の工程で問題が発生していないか確認して下さい。
陽性コントロールが正確な結果を示さない（濁度が上昇していない、色が変化していない）	**A. Positive Control Ssd の添加量が過剰である。** Positive Control Ssd の添加量が過剰であるとマスターミックスが希釈され検査反応の効率が低下する場合がありますので、添加量はマニュアルの指示に従って下さい。 **B. 反応温度、操作手順に誤りがある。** 検査の工程で問題が発生していないか確認して下さい。
試薬が不足する	**A. チューブ内壁に試薬が飛散、付着している。** 使用前にスピンダウンを行って下さい。 **B. 保存中に試薬が蒸発している。** 使用後はキャップを完全に閉じて下さい。
DNA 抽出液を凍結融解させ、長時間静置しても白濁が消失しない。	**検査環境の温度が低い。** DNA 抽出液は低温度だと析出する恐れがあります。白濁が消失しない場合は 50℃前後で DNA 抽出液を保温してからご使用下さい。

VI 参考文献・資料

1. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, Hase T. (2000) Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* **28** (12): e63

2. Prince AM, Andrus L. (1992) PCR: how to kill unwanted DNA. *Biotechniques.* **12** (3): 358

・記載内容や製品仕様、価格に関しては予告無しに変更する場合があります。

・本マニュアルの記載内容は2015年5月現在のものです。最新のマニュアルは株式会社ニッポンジーンホームページからダウンロードして下さい。

・「Loopamp®」は、栄研化学株式会社の登録商標です。

・「ニッポンジーン®」および「NIPPON GENE®」は、株式会社ニッポンジーンの日本における登録商標です。

・その他、製品名等の固有名詞は各社の商標あるいは登録商標です。

・記載内容の複製、転載を禁止します。

本品に関するお問い合わせ先	
株式会社ニッポンジーン	
TEL	076-451-6548
FAX	076-451-6547
E-mail	support@nippongene-analysis.com
URL	http://nippongene-analysis.com

ご購入に関するお問い合わせ先	
株式会社富士通システムズ・イースト	
TEL	03-6712-3885
FAX	03-6712-3886
E-mail	feast-egenome@cs.jp.fujitsu.com
URL	http://genome.e-mp.jp

Copyright © 2015 NIPPON GENE CO., LTD. All Rights Reserved.